

На правах рукописи

ТАЗЕТДИНОВА ДИАНА ИРЕКОВНА

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ВЫЩЕЛОЧЕННЫХ ЧЕРНОЗЕМОВ
ЮГО-ВОСТОКА РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН**

03.00.04. – биохимия

03.00.07. – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2008

Работа выполнена на кафедре микробиологии ГОУ ВПО «Казанский государственный университет им. В.И.Ульянова-Ленина»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Алимова Фарида Кашифовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, доцент
Кураков Александр Васильевич,
(Московский государственный университет
им.М.Ю.Ломоносова, г.Москва)

доктор биологических наук, в.н.с.
Чиков Владимир Иванович
(Казанский институт биохимии биофизики
КНЦ РАН, г.Казань)

Ведущая организация: Казанский государственный
аграрный университет, г. Казань

Защита диссертации состоится 30 октября 2008 года в 13 часов на заседании
Диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском государственном
университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18, аудитория 211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И.
Лобачевского Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова-
Ленина

Автореферат разослан « 27 » сентября 2008 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,

доктор биологических наук



З.И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Одной из проблем современного земледелия является потеря плодородных почвенных ресурсов. Особенно остро эта проблема стоит для регионов, подверженных техногенезу. В структуре земельного фонда Республики Татарстан (РТ) основная доля приходится на земли сельскохозяйственного назначения (67%). При этом большая часть плодородных черноземов сосредоточена в Юго-Восточном Закамье республики. На их территориях действуют предприятия нефтегазодобывающей отрасли, машиностроения и сельского хозяйства. Экологическая ситуация в этих регионах официально оценивается как «тревожная» и «тяжелая» [Атлас РТ, 2005]. Пахотные черноземы давно испытывают однотипное воздействие и многократно проходили полные циклы севооборота (антропогенный почвообразовательный процесс). На тех же полях ведется интенсивная добыча нефти. Важнейший фактор, влияющий на состояние микробных сообществ в почвах – загрязнение тяжелыми металлами и углеводородами [Иванов с соавт., 2007]. Характер взаимодействия тяжелых металлов (ТМ) с почвенными компонентами зависит от многих факторов и определяет возможность дальнейшей миграции ТМ в грунтовые воды, их доступность растениям, потенциальную угрозу живым организмам, в т.ч. человеку. Биологическая активность почвы является важным фактором ее плодородия и чувствительным экологическим и агрономическим индикатором воздействия на нее.

Плодородие почв существенно зависит от состояния почвенной биоты [Мирчинк, 1988; Хамова и др., 2002; Добровольский, Умаров, 2004; Нетрусов с соавт., 2004; Марфенина, 2005]. Одним из показателей плодородия является почвенная супрессивность – это совокупность биологических, физико-химических и агрохимических свойств почвы, обеспечивающих развитие полезной микрофлоры или микроорганизмов–супрессоров, затрудняющих развитие фитопатогенных форм микобиоты в критический для нее период [Филипчук, 1997; Чулкина, 2000]. Так, супрессивность отдельных типов почв связывают с наличием жизнеспособных пропагул *Trichoderma*. Представителей этого рода считают, по крайней мере, частично ответственными за эффект биологического контроля фитопатогенов в супрессивных почвах, на которых зерновые и деревья не подвергаются действию патогенов и микотоксинов, выделяющихся в окружающую среду [Kubicek *et al.*, 2001; Cotxarrera *et al.*, 2002; Benítez *et al.*, 2004; Емцев, Мишустин, 2005; Алимова с соавт., 2007].

Почвенный покров Альметьевского и южной части Сармановского р-на типичен для Юго-Восточного Закамья РТ. Это позволяет использовать названный район в качестве прототипа при прогнозировании результатов загрязнения вышеуказанных регионов, а также других черноземных регионов России при интенсивном и бесконтрольном развитии в них индустрии [Судницын, Сашина, 2006].

В связи с вышесказанным большой практический интерес представляет мониторинг выщелоченного чернозема Юго-востока РТ, анализ распространенности и сохранения видового разнообразия грибов-супрессоров рода *Trichoderma* в антропогенно нарушенной почве, а также возможность их использования для биоремедиации техногенных ландшафтов.

Целью данной работы явилась оценка последствия антропогенной нагрузки на биологическую активность выщелоченных черноземов Юго-Восточного района республики Татарстан.

Основные задачи исследования:

1. Исследовать влияние тяжелых металлов на биологическую активность выщелоченного чернозема РТ на фоне острого типа нефтезагрязнения и после рекультивации.
2. Охарактеризовать микромицеты антропогенных ландшафтов, ответственные за супрессивность почв, на примере рода *Trichoderma*.
3. Изучить влияние тяжелых металлов на *Trichoderma* на уровне сообщества, популяции, организма и клетки в опытах *in vitro*.
4. Исследовать супрессивность агроценозов в зоне техногенеза Юго-Восточного Закамья РТ на фоне интродукции микромицетов рода *Trichoderma*.

Научная новизна. Впервые дана биологическая характеристика и проведен сравнительный микробиологический мониторинг нарушенных антропогенных ландшафтов центральной и восточной части Альметьевского и южной части Сармановского р-нов Юго-Восточного Закамья. Впервые выявлены мишени воздействия синергического загрязнения ТМ на фоне нефтезагрязнения.

Впервые из нарушенных антропогенных ландшафтов Юго-Восточного Закамья РТ выделены и изучены виды *Trichoderma*, ответственные за супрессивность почв. Выявлен штамм, адаптированный к высоким концентрациям нефти, характерной для зоны стресса. Впервые для почв территории Татарстана показано наличие резистентных к хроническому типу нефтезагрязнения видов актиномицетов.

С помощью атомно-силовой микроскопии выявлены морфологические изменения *Trichoderma* на фоне антропогенного воздействия. Отмечено накопление частиц тяжелых металлов на поверхности вегетативных органов микромицетов.

Впервые показана возможность использования высокоэффективных штаммов *Trichoderma* для получения биопрепарата для восстановления супрессивности почвы техногенных ландшафтов нефтедобывающих районов.

Практическая значимость. Полученные результаты были использованы для написания учебно-методического пособия «Биотехнология. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*», используемого в курсе «Биотехнология». Полученные данные по почвенному мониторингу могут быть использованы в учебном процессе в рамках дисциплин «Биохимия почв», «Биология почв», «Экология микроорганизмов», для создания почвенных карт биологической

активности черноземов, их изменения на фоне техногенного загрязнения, а также подходов для их восстановления.

Предложен и испытан в полевых условиях штамм, перспективный для восстановления супрессивности и плодородия техногенных ландшафтов и показана возможность использования *T.asperellum* 556 для переработки отходов предприятий пищевой промышленности.

Получены положительные отзывы от предприятий по предварительным опытам использования штаммов *Trichoderma* в сельскохозяйственной и пищевой промышленности РТ.

Связь работы с научными программами. Исследования поддержаны грантами Академии наук РТ № 04-4.6-28/2006(Г), № 09-9.3-61/2006(Г), ОАО «Татнефть» № 0002/34/491-42/4312006/н, Фондом содействия развитию малых форм предприятий №6073Р/8513. Результаты экспериментов и основные научные положения, изложенные в диссертации, получены автором.

Положения, выносимые на защиту

1. Антропогенная нагрузка в виде синергического воздействия высоких концентраций тяжелых металлов на фоне нефтезагрязнения в выщелоченных черноземах Юго-Восточного Закамья приводит к нарушению функционирования почвенного микробного сообщества, вследствие чего наблюдается почвоутомление и возрастание инфекционного фона почвы. Мишенями антропогенного воздействия являются микроорганизмы, участвующие в круговороте азота и, формирования гумуса, а также биохимическая активность почв (протеазная и целлюлазная активности).

2. Нефтезагрязнение на фоне возрастающих доз тяжелых металлов вызывает у почвенных микромицетов рода *Trichoderma* перегруппировку в структуре сообщества (переход из зоны гомеостаза в зону резистентности), а также возрастание гетерогенности популяции с преобладанием клонов, характерных для экстремальных зон и фитотоксичными свойствами. Отмечено формирование наночастиц меди на поверхности клеточных стенок при контакте с металлом в условиях *in vitro*.

3. Высокоэффективные штаммы *Trichoderma* из черноземов Юго-Востока РТ могут быть использованы для восстановления супрессивности почв и защиты овощных культур.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на итоговых научно-образовательных конференциях Казанского государственного университета (Казань, 2004 - 2008), «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение» (Казань, 2005), «Грибы и водоросли в биоценозах» (Москва, 2006), «Итоги и перспективы научных исследований по проблеме экологии человека и гигиены окружающей среды» (Москва, 2006), «9th International Workshop on Trichoderma and Gliocladium» (Vienna, 2006), «Symposium of Biology Students (Ancona, 2006), «Экология и биология почв»

(Ростов-на-Дону, 2006), 8th International Mycological Congress (Cairns, 2006). «Биология- наука 21 века» (Пушино, 2006, 2007), «Ломоносов – 2007» (Москва, 2007), «International Mycological SymBioSE» (2006), «Успехи медицинской микологии» (Москва, 2007), «Межвузовская конференция молодых ученых и студентов (Казань, 2007), «Научно-техническое творчество молодежи» (Москва, 2007), «Микроорганизмы и биосфера» (Москва, 2007), «Современные достижения бионаноскопии» (Москва, 2008), «Симбиоз» (Казань, 2008), «II-ая Международная научно-практическая конференция «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань, 2008).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано и сдано в печать 50 научных работ, из них – 1 учебно-методическое пособие, 9 статей, в том числе 4 в изданиях рекомендуемых ВАК РФ.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю д.б.н. доц. Алимовой Ф.К. за внимательное отношение к работе; д.б.н., проф. Ильинской О.Н. за возможность проведения микробиологических исследований на базе кафедры микробиологии; д.м.н., проф. Иванову А.В. (КГМУ) за помощь при отборе и химическом анализе почв в Юго-Восточном Закамье; к.х.н., с.н.с. Гарусову А.В. за помощь при хроматографических исследованиях азотфиксации и респираторной активности почв; инж. Мочаловой Н.К. и инж. Пономаревой А.З. за консультации при проведении микробиологического мониторинга почв; к.б.н., асс. Зеленихину П.В. за помощь при проведении микрофотосъемки грибов; к.б.н., асс. Кравцовой О.А. и к.б.н., доц. Ризванову А.А. за помощь в проведении молекулярно-генетических исследований штаммов *Trichoderma*; к.б.н., с.н.с. Акберовой Н.И. за консультации по статистической обработке данных; к.б.н., асс. Абдуллину Т.И. за помощь в проведении исследований наночастиц металлов на поверхности *Trichoderma*; к.б.н., доц. Бабынину Э.В. за помощь в проведении исследований генотоксичности; аспиранту Морозову М.В. за помощь в проведении АСМ-микроскопии; к.б.н., с.н.с. Частухиной И.Б. (ООО «Алчак») за помощь в проведении полевых испытаний биопрепарата; к.б.н., н.с. Скворцову (ВНИИВИ) и инж. Мельниковой Т.А. (ОАО «Холод») за помощь в проведении исследований ферментативной активности; с.н.с. Глушко Н.И. и к.б.н., с.н.с. Куликову С.Н. (ФГУН КНИЭМ) за помощь в получении и изучении свойств грибных антигенов; д.б.н., доц. Шинкареву А.А. за консультацию при составлении выборки почв; аспирантам и студентам лаборатории сельскохозяйственной биохимии и биотехнологии кафедры биохимии.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 160 страницах машинописного текста и включает 40 рисунков и 12 таблиц. Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, содержащей методы и результаты исследования, обсуждения, выводов и списка литературы, который содержит 190 ссылок, из них 100 иностранные и приложения.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Образцы почвы отобраны в Юго-Восточном Закамье в районе пгт Н.Мактама, с.Абдрахманово, с.Рангазар в 2006 году (схема 1) в соответствии с правилами отбора проб для микробиологического анализа [Захарова с соавт., 2005]. Агрохимическая характеристика: выщелоченный тяжелосуглинистый среднегумусный среднемощный чернозем со слабой водной эрозией, гумус 8%; Нобщ 6140 мг/кг; P_2O_5 подв. 121 мг/кг; K_2O обм. 137 мг/кг.

Таблица 1

Схема опыта

Варианты опыта	Исследуемые образцы
Контроль	Фоновая почва (целина)
Загрязненные почвы (нефтепродукты+тяжелые металлы)	Вблизи нефтескважины (хроническое загрязнение)
	Разлив нефтепродуктов (острое загрязнение)
Рекультивированные почвы (нефтепродукты+тяжелые металлы)	2 месяца рекультивации
	2 года рекультивации
	6 лет рекультивации
Агроценоз под зерновыми (тяжелые металлы)	Агроценоз 1
	Агроценоз 2
	Агроценоз 3

Исследуемые микроорганизмы

А) В работе были использованы аборигенные штаммы грибов *Trichoderma* выделенные нами из антропогенно-нарушенной почвы на территории РТ. Штамм *T. asperellum* 302, выделенный из погребенной почвы Мурзихинского II могильника (Алексеевский район, РТ), использован в качестве контроля – не затронутого антропогенным воздействием при изучении ферментативной активности и влияния тяжелых металлов.

Б) Грибы: *Alternaria tenuis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor pusillus*, *Neurospora sitophila*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium tardum*, *Phoma Betae*, *Rhizopus nigricans*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Trichophyton rubrum* (коллекции КНИИЭМ) использованы для изучения перекрестных реакций аллергенов.

Изучение биологической активности почвы

Исследование содержания тяжелых металлов определяли ИТР-спектрометрией на атомно-эмиссионном спектрометре Optima-2000DIV. Минеральный состав почв определяли с помощью фазового рентгеновского анализа (рентгеновский дифрактометр D8 ADVANCE, Bruker).

Активность азотфиксации в почве измеряли методом Харди в модификации Умарова [Гарусов с соавт., 2006], определение активности почвенного дыхания осуществляли на газовом хроматографе [Гарусов с соавт., 2006]. Определение

углерода активной микробной биомассы проводили по интенсивности выделения CO_2 из почвы, обогащенной субстратом (V_{slr}) [Благодатская, Ананьева, 1996].

Определение уреазной активности почвы проводили методом Колешко [Хазиев, 2005], целлюлозолитической активности почвы – аппликационным методом [Хазиев, 2005], протеолитической активности почвы методом Галстяна [Хазиев, 2005], каталазной активности почвы методом Канцельсона и Ершова [Хазиев, 2005].

Определение биомассы микроорганизмов в почве проводили методом прямого счета в люминесцентном микроскопе по Звягинцеву и Кожевину [Головченко и др., 1995; Кожевин, 1989; Методы ..., 1991], определение структуры сообществ проводили на плотных питательных средах, численности – на плотных и жидких питательных средах [Захарова с соавт., 2005]. Идентификацию актиномицетов проводили по [Зенова, 1992].

Изучение грибов рода *Trichoderma*

Выделение *Trichoderma* из образцов почвы проводили методом серийных разведений с последующим высевом на среду с пароморфогенным веществом [Бенкен, Хацкевич, 1972]. Моноспоровые культуры грибов получали методом Лихачева [1994] на жидких питательных средах с добавлением глицерина до получения ими определенной вязкости.

Морфолого-культуральные свойства изучали на минеральной среде, картофельно-глюкозном агаре (КГА), среде Чапека-Докса с низким содержанием сахарозы [Захарова с соавт., 2005; Алимова, 2006], специальном питательном агаре (SNA) [по Samuels et al., 1998]. Для культивирования использовали как твердые (агаризованные), так и жидкие среды.

Идентификация по морфологическим признакам проводилась по ключу Александровой [Александрова с соавт., 2001], Samuels [2003] и Шавери [Chaverri et al., 2003]. Размеры объектов замеряли с помощью окуляра–микрометра.

Определение цвета колонии, что необходимо для описания изолятов проводили двумя способами. С помощью шкалы Бондарцева [1959] и с помощью модели RGB. Модель RGB описывает излучаемые цвета и основана на трех базовых цветах - Red (Красный), Green (Зеленый), Blue (Синий). Остальные цвета образуются при смешивании этих трех основных.

Вегетативную совместимость моноспоровых клонов изучали сращиванием от двух до восьми колоний на чашках Петри на среде картофельно-глюкозный агар, с последующим визуальным наблюдением за поведением колонии и микроскопированием пограничной зоны между колониями, что позволило наблюдать за анастомозами и оценить относительную частоту их образования. Характер проявления реакций при визуальной оценке и микроскопировании сравнивали с описаниями, приведенными у Дьякова и Долговой [1995].

Антагонистическую активность и конкурентоспособность изолятов *Trichoderma* определяли методом встречных культур на среде Чапека, КГА [Симонян и Мамиконян, 1982].

Гетерогенность популяций выделенных изолятов оценивали по их разделению на культурально-морфологические типы (КМТ) и появлению секторов при росте на чашках Петри [Дьяков, 1998].

Определение ксиланазной и протеазной активностей изолятов *Trichoderma* проводили по Кониг [Konig, 2002] на средах: с высокой концентрацией сложных углеводов (отход спиртового производства) и щелочном ржаном экстракте.

Определение фитотоксичности почвы и КЖ проводили на семенах злаковых и микрорастениях картофеля [Методы ..., 1991].

Выделение ДНК проведено фенол/хлороформным методом, ПЦР-анализ по [Druzhinina *et al.*, 2005]. Исследовались участки ядерной рДНК, содержащий ITS1 и 2 и гена *tef1*. Режимы ПЦР - амплификации: а) денатурация ДНК - 95⁰С; 1 мин, б) отжиг праймеров - 54⁰С; 1,5 мин, в) элонгация - 72⁰С; 1 мин. Результаты ПЦР оценивались в агарозном и полиакриламидном гелях различной концентрации. Результаты секвенирования фрагмента гена *tef1* обрабатывали при помощи пакета программ Lasergene 5.03 (DNASTAR, Inc., США). Программа SeqMan использовалась для анализа секвенсных хроматограмм. Программа MegAlign использовалась для выравнивания последовательностей и экспорта их в формате GCG.

Определение генотоксичности *Trichoderma* проводили полуколичественным методом учета генных мутаций (тест Эймса) [Ames, Lee, 1973].

Изучение морфологии поверхности спор *Trichoderma* проводили полуконтактным методом на атомно-силовом микроскопе NTEGRA Prima (NT-MDT) [Миронов, 2004; Бухараев с соавт., 2006].

Для изучения влияния ионов металлов на морфологию *Trichoderma* и свойства антигенных препаратов грибов использовали следующие соли: ZnSO₄ x 7H₂O, NiNO₃, CuSO₄ x 5H₂O, FeSO₄ x 7H₂O, AlCO₃ x 6H₂O в концентрациях: 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 и 0.8 мг/мл.

Изучение накопления частиц меди на поверхности *Trichoderma* проведено вольт-амперометрическим методом [Абдуллин с соавт., 2007].

Определение количества белка проводили по Брэдфорду [Северин, Соловьева, 1989], нуклеиновых кислот – по Спирину [Северин, Соловьева, 1989], реакцию преципитации – по Оухтерлони методом встречной иммунодиффузии [Китти, 1991], гель-хроматографического профиля антигена – с использованием сефадекс-100 [Фримель, 1987].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью электронных таблиц Microsoft Excel, Statgraphics plus 2.1. Взаимосвязь ряда факторов устанавливали посредством расчета коэффициента корреляции. Для сравнения применяли интервальные оценки. Уровень значимости, примененный в работе, Р < 0,05. Данные в таблицах представлены как среднее ± 2 стандартное отклонение, в графиках – в виде структурных характеристик (медиана, персентили 0.025, 0.975).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1 Характеристика почв Юго-Восточного Закамья

1.1 Содержание тяжелых металлов в почве

При оценке экологической опасности почвенного загрязнения тяжелыми металлами (ТМ) принимается во внимание не только его интенсивность, но и состав загрязнителей, и, в первую очередь, присутствие элементов, относимых к 1 и 2 классам гигиенической опасности в соответствии с ГОСТ № 17.4.1.01-83. Нами исследовано загрязнение следующими металлами: 1 класс - мышьяк (As), ртуть (Hg), свинец (Pb), цинк (Zn), кадмий (Cd) и 2 класс - медь (Cu), хром (Cr) и кобальт (Co). Очаги техногенного загрязнения, как правило, представляют собой избыточную концентрацию не одного, а целого комплекса химических элементов. Каждый из них может быть охарактеризован с помощью коэффициента концентрации химического вещества (Кс), который определяется отношением его реального содержания в почве (С) к фоновому (Сф) (табл. 1).

Таблица 1

Коэффициент концентрации загрязнителя (Кс) в исследованных почвах

Образцы	Металлы						
	As	Pb	Hg	Zn	Cu	Ni	Zc
Контроль (фон)	1.98	0.55	0.16	0.63	0.88	1.29	5.49
Агроценоз 1	2.98	0.48	0.35	0.85	1.37	4.11	7.82
Агроценоз 2	2.73	0.55	0.80	0.92	1.61	1.60	6.78
Агроценоз 3	2.27	0.60	0.23	0.72	1.52	3.18	8.04
Л1 (луг 6 лет)	1.91	0.63	0.19	0.82	1.56	1.79	9.23
Л2 (луг 2 г.)	1.25	0.49	0.28	0.72	1.44	1.42	7.35
Л3 (луг 2 мес.)	3.62	0.46	0.30	1.09	1.50	1.44	8.56
С1 (скважина 1)	1.21	0.37	0.67	0.81	1.60	1.64	6.32
С2 (скважина 2)	2.00	0.53	0.20	0.90	2.04	2.42	8.08
НП (разлив нефтепродуктов)	3.00	0.46	0.30	0.81	1.42	1.28	7.27
Кс металла для всех образцов*	2.30± 1.57	0.51± 0.16	0.35± 0.44	0.83± 0.25	1.49± 0.57	2.02± 1.89	

Для характеристики интегрального воздействия химических элементов на окружающую среду использован суммарный показатель загрязнения Zc. Как показали результаты, образцы почв характеризуются минимальным уровнем загрязнения ($Zc < 8$) по исследованным ТМ.

В качестве условного контроля (фоновая почва) была выбрана целинная почва под растительной формацией. Исследованная почва в основном имеет низкие значения Кс, а также характеризуется наименьшим значением суммарного показателя загрязнения (5.49).

Наибольшее превышение фонового содержания отмечено для мышьяка, меди и никеля. Считается, что самыми сильными источниками загрязнения

мышьяком являются гербициды, фунгициды и инсектициды. Это согласуется с полученными нами данными – высокие значения Кс мышьяка отмечены в образцах, отобранных в агроценозах, где могли использоваться эти химикаты.

Для оценки степени химического загрязнения почв использовали коэффициент опасности (Ко), который показывает во сколько раз содержание элемента-загрязнителя в пробе выше его ПДК. Опасность загрязнения почвы тем выше, чем больше значение Ко превышает 1. Наибольшее превышение ПДК отмечены для As (6.4) и Cu (1.5). Содержание свинца, ртути и цинка не превышало ПДК и кроме того было близко к фоновому (табл.1).

Таким образом, показано, что наибольший вклад в загрязнение почв Юго-Восточного Закамья вносят мышьяк и медь.

1.2 Биологическая активность выщелоченного чернозема Юго-Восточного Закамья

Важными показателями изменения состояния биологических систем является изменение биомассы микроорганизмов [Ананьева с соавт., 2006]. В целинной почве исследуемой зоны отмечено преобладание суммарной биомассы грибов (в 17.5 раз) по сравнению с бактериями. Исследование только биомассы спор в почве может дать представление о покоящемся запасе (пуле) грибов [Марфенина, 2005]. Для целинного тяжелосуглинистого чернозема Альметьевского района эта величина составила 265 мг/ г почвы. Изменение биомассы мицелия может отражать в целом активизацию или ингибирование развития грибов в почве [Марфенина, 2005]. В весенний период биомасса грибного мицелия составила 107.64 мг/г почвы, а бактерий – 21.25 мг/г почвы. Величина общей суммарной биомассы бактерий и грибов указывает только на запас микроорганизмов определенного типа почвы [Звягинцев, 1996]. Особенности его функционирования обычно оценивают исходя из величины активной биомассы (C_{mic}), определяемой по интенсивности выделения CO_2 из почвы, обогащенной субстратом (V_{sir}) [Ананьева с соавт., 2006]. Углерод активной биомассы составил 448.80 мкг/ г почвы.

Уровень базального и субстрат-индуцированного дыхания целинного чернозема составил 6.15 и 11.2 мг CO_2 -С/кг, соответственно, азотфиксации – 0.08 мг N/кг*час.

Микробиологический мониторинг почвы

Известно, что микроорганизмы вносят значительный вклад в формирование почвенного плодородия, участвуя в превращениях гумуса, минеральных элементов, целлюлозы [Мирчинк, 1988; Хамова и др., 2002; Добровольский, Умаров, 2004; Нетрусов с соавт., 2004; Емцев, Мишустин, 2005; Киреева с соавт., 2005]. Рассмотрена структура сообщества аэробных целлюлолитиков при хроническом (почва вблизи нефтескважин), остром (разлив НП) загрязнении и эффект последствий рекультивации в течение 2 и 6 лет (рис. 1).

В целинной почве отмечено доминирование грибов в структуре сообщества целлюлолитиков. Наибольшая частота встречаемости целлюлозоразрушающих

бактерий отмечена в почвах с хроническим загрязнением и в результате рекультивации в течение 6 лет, где они были отнесены к группе доминирующих. При остром и хроническом загрязнении целлюлозоразрушающие грибы перешли из группы доминирующих в группу типично редких. Вероятно, это могло стать следствием недостаточного содержания кислорода в загрязненных почвах, а также антагонистического взаимодействия с возросшей долей бактерий. В результате загрязнения почвы произошло замедление процесса разрушения целлюлозы: в замазученной почве в 1.8 раза по сравнению с контролем. Так же достоверно ниже убыль субстрата была вблизи скважины (в 9 раз) и в рекультивированных почвах (в 2 раза). При изучении влияния тяжелых металлов и pH на сообщество гетеротрофов не выявлено никакой корреляции.

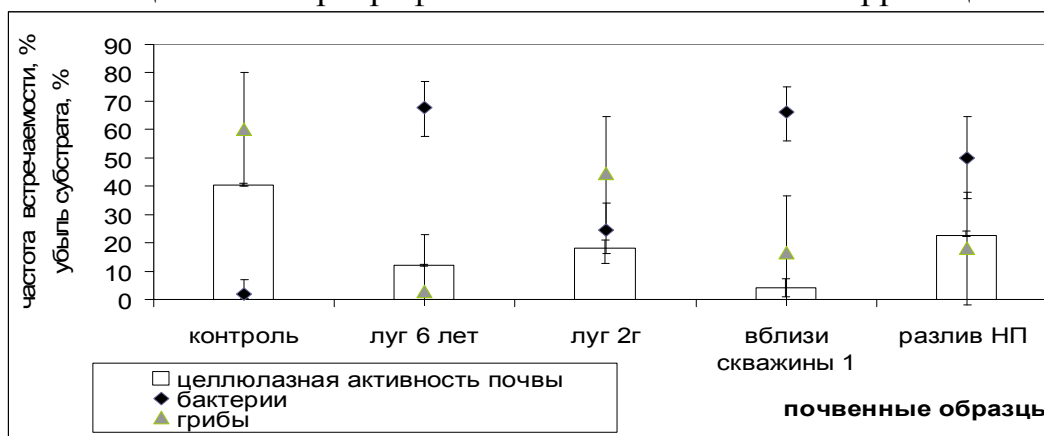


Рис. 1. Структура сообщества целлюлолитиков и целлюлазная активность почвы.

При изучении влияния тяжелых металлов и pH на автохтонную микрофлору достоверная положительная корреляция отмечена только для мышьяка ($r=0.83$; $y=4.641x^2-86.63x+689.7$). Наибольшее содержание автохтонной микрофлоры выявлено в почве со сроком рекультивации 2 месяца ($627.55 \cdot 10^3$ КОЕ/г почвы). В остальных вариантах не было достоверного отличия от контроля.

Наибольшая численность спорообразующих бактерий отмечена в почвах под 6-летним лугом и вблизи скважины (рис. 2А). В остальных образцах численность не превышала $1 \cdot 10^3$ КОЕ/г абс.сух.почвы.

Комплекс почвенных актиномицетов чувствителен к нефтяному загрязнению, что проявляется в снижении его численности. Численность актиномицетов в почве возле скважины в 54 раза была ниже по сравнению с контролем (рис.2Б). Негативное влияние нефти на численность актиномицетов может быть обусловлено как токсичностью углеводородов, так и недостаточной аэрацией почвы в результате хронического загрязнения почвы возле скважины. Такое значительное достоверное снижение численности отмечено и в почвах агроценозов. Актиномицеты являются показателями зрелых экосистем. Снижение их численности в почвах техногенного района также может свидетельствовать о сукцессии микроорганизмов [Звягинцев, Зенова, 2001]. О преобразовании зрелой экосистемы в молодую может свидетельствовать и

преобладание биомассы грибов, которые развиваются на первом этапе микробной сукцессии, над биомассой бактерий в исследованных почвах Юго-Западного Закамья [Мирчинк, 1976; Щербаков с соавт., 2002]. В почве, отобранной у нефтяной скважины, выявлено 13 видов, в агроценозах – 3 вида, в рекультивированных – 6 видов актиномицетов.

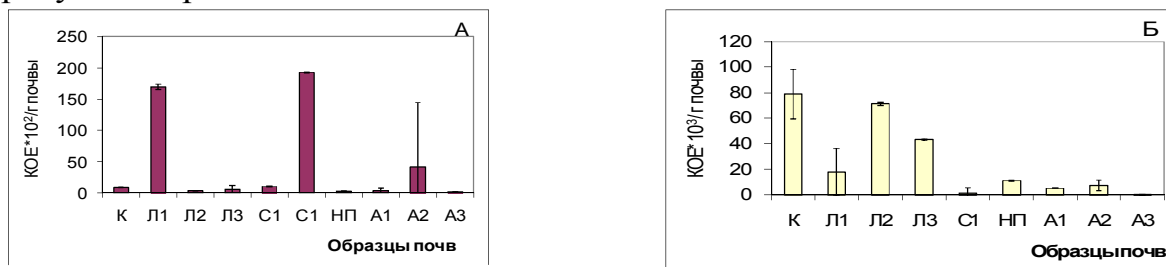


Рис 2. Количество спорообразующих бактерий (А), актиномицетов (Б). К- контроль, Л1- луг 6 лет, Л2- луг 2 года, Л3- луг 2 месяца, А1, А2, А3- агроценозы, С1- скважина, НП – разлив нефтепродуктов.

Загрязнение почвы ТМ и НП ведет к изменению численности микроорганизмов, участвующих в круговороте важнейшего элемента питания – азота. В микрорайоне с синергическим воздействием загрязнителей отмечено снижение численности микроорганизмов, использующих минеральный азот, в результате замазучивания почвы (в 93 раза по сравнению с целиной), хроническое загрязнение почвы не оказало значимого действия на снижение численности микроорганизмов. Ко 2 году рекультивации численность микроорганизмов оставалась ниже контроля (в 2.7 раз), но отмечена тенденция к восстановлению микробного пула – численность возросла по сравнению с замазученной почвой (в 33 раза). Отмеченная положительная корреляция ($r=0.72$) численности микроорганизмов, использующих минеральный азот, со спорообразующими бактериями может указывать на переход части сообщества в неактивное состояние.

Наибольшая численность аммонификаторов наблюдалась в почвах целины ($2 \cdot 10^6$ КОЕ/г почвы), под 6 летним лугом и агроценоза-3 (однако в 70 и 46 раз, соответственно, была ниже целины). С увеличением техногенной нагрузки их численность достоверно снижалась. При этом отмечена положительная корреляция численности аммонификаторов с численностью автохтонной микрофлоры ($r=0.82$).

Численность денитрификаторов увеличилась в образцах: агроценоза-2, вблизи скважины-1 и при разливе НП (в 2, 4 и 19 раз, соответственно, по сравнению с контролем), что связано с анаэробными условиями и наличием большого количества легкоразлагаемой органики.

Возрастание численности автохтонной микрофлоры, специализирующейся

на разложении сложных соединений, (в 2.5 раза по сравнению с контролем) в почве на ранних этапах рекультивацией (2 месяца), вероятно, свидетельствует о более высокой степени гумифицированности органического вещества [Андреюк, 1988].

Отмечено возрастание численности олиготрофной микрофлоры, являющейся основным утилизатором органического вещества, во агроценозе-2 (в 2.5 раза по сравнению с контролем) что вероятно указывает на завершение минерализации органических соединений [Емцев, Мишустин, 2005]

Наибольшая численность копиотрофов отмечена в почве с 2-летним сроком рекультивации (77% от контроля). В почвах с синергичным действием загрязнителей их численность была на одном уровне и не превышала 16% от контроля. В почвах агроценозов численность этой группы микроорганизмов также была низкой: в 1 и 3 агроценозах – 11 и 13 %, соответственно, в 3 агроценозе – в 3 раза ниже контроля.

Интенсивность почвенного дыхания и азотфиксации

Одним из показателей физиологической активности микроорганизмов, отражающей интенсивность окислительно-восстановительных процессов в почве, является интенсивность дыхания [Заварзин, 2003; Ленглер с соавт., 2005]. В целинной почве базальное дыхание (V_{basal}) составило 6.15 и субстрат-индуцированное дыхание (V_{sir}) 11.63 $\text{mgCO}_2\text{-C/kg}$. В рекультивированных почвах величина V_{basal} достоверно не менялась, а V_{sir} с увеличением загрязнения ТМ возросло в 1.5 раз по сравнению с контролем. В агроценозах с увеличением загрязнения ТМ V_{basal} достоверно увеличивалось (в 2 раза по сравнению с целиной), в то время как V_{sir} достоверно не менялось. В почвах с синергичным действием загрязнителей базальное дыхание почв вблизи скважин достоверно не отличались от почвы с разливом НП, в которой V_{sir} в 3 раза было меньше контроля.

Стимуляция азотфиксирующей активности отмечена только в почве одного из агроценозов (3-й) (в 6 раз по сравнению с целиной).

Метаболический коэффициент ($q\text{CO}_2$) является показателем развития почв и может быть индикатором хода экологической сукцессии наземной экосистемы [Ананьева с соавт., 2002]. Наибольшая величина метаболического коэффициента выявлена в 3-м агроценозе и в почве со сроком рекультивации 2 месяца (1 и 0.77 $\text{mgCO}_2\text{-C/kg}$, соответственно), что свидетельствует об интенсивных процессах разложения в этих почвах. Помимо реакции на внесение органического вещества, увеличение $q\text{CO}_2$ является общим ответом почвенной микробной биомассы на длительное загрязнение тяжелыми металлами и не зависел от значений pH почвы. В почвах с синергическим загрязнением ТМ и НП значения метаболического коэффициента достоверно не различались и не превышали 0.28 $\text{mgCO}_2\text{-C/kg}$. При изучении влияния загрязнения почвы тяжелыми металлами на величину метаболического коэффициента ($q\text{CO}_2$) выявлена достоверная средняя отрицательная корреляция с содержанием мышьяка ($y = 0,013x1.329$; $r=-0.69$).

Наибольшее значение метаболического коэффициента наблюдалось в почве с высоким содержанием As. Возрастание величины метаболического коэффициента почвы в результате природных и антропогенных воздействий может свидетельствовать об изменении экофизиологического статуса микроорганизмов и, тем самым, быть показателем нарушения или стресса в микробном сообществе. С увеличением концентрации мышьяка метаболический коэффициент возрастал, следовательно, возрастала и степень стресса в микробном сообществе. Токсическое воздействие мышьяка (на фоне других загрязнителей) могло стать причиной снижения уровня почвенной биомассы в результате гибели микробных клеток в почве с 2-месячным сроком рекультивации, что могло вызвать увеличение qCO_2 .

Ферментативная активность почвы

Изменение уровня биологической активности может служить мерой антропогенного воздействия на почвы. Проведено исследование влияния тяжелых металлов и pH на ферментативную активность почв. Для исследования выбрано четыре фермента: уреазы, протеазы, каталазы, целлюлазы, как наиболее чувствительных к антропогенным нагрузкам [Хазиев, Фатхиев, 1981; Звягинцев с соавт., 1982; Lai *et al.*, 1999; Rost *et al.*, 2001; Новоселова, 2004; Киреева с соавт., 2006].

При изучении ферментов трансформации соединений азота отмечено, что уреазная активность проявила чувствительность к исследованным концентрациям марганца ($y = -3E-05x^2 + 0.0405x - 13.694$; $r = -0.73$) и острому типу загрязнения (образец НП). А протеазная активность проявила чувствительность к меди и хрому ($y = 0.0019x^2 - 0.1594x + 3.4263$; $r = -0.90$ и $y = -0.0009x^2 + 0.0981x - 1.9215$; $r = -0.97$, соответственно) при данных концентрациях. Уровень активности ферментов повышается к 6 году рекультивации.

Каталазная активность почвы проявила чувствительность к Pb ($y = 0.011x^2 - 0.206x + 0.899$; $r = -0.68$) и Hg ($y = 0.0119x^2 - 0.206x + 0.89$; $r = 0.82$) при исследованных концентрациях. Наибольшие концентрации Pb наблюдаются в гумусовых горизонтах, что объясняется образованием стабильных Pb^{2+} -органических комплексов [Карпухин, 1998; Водяницкий, 2006]. Выявленная в наших экспериментах низкая чувствительность каталазной активности к меди в дозе до 100 мг/кг подтверждается результатами других авторов [Галиулин, 2006].

Отмечена зависимость между содержанием марганца и целлюлазной активностью ($y = 1E-12x^4.520$; $r = 0.83$). В почвах с хроническим и острым загрязнением активность фермента достоверно снизилась. Причем большее снижение активности отмечено вблизи скважины (в 4.8 раз по сравнению с контролем). Активность многих почвенных ферментов, в том числе и целлюлаз, в наибольшей степени проявляется при иммобилизации их на носителях – гумусовых кислотах [Киреева и др., 2000]. Вероятно, ингибирование активности целлюлазы при загрязнении можно объяснить нарушением процессов иммобилизации ферментов вследствие изменения насыщенности основаниями

почв. Может быть, происходит инактивация ферментного комплекса продуктами окисления или сополимеризации нефтяных углеводородов на носителе – гуминовых веществах.

Для антропогенно нарушенных черноземов Юго-Восточного Закарья построен следующий ряд ферментов по убыванию чувствительности к синергическому типу загрязнения: целлюлаза - протеаза > уреаза > каталаза. Это, безусловно, будет определять возможность их практического использования для индикации загрязнения почвенного покрова металлами.

Фитотоксичность почв

Показано, что техногенные ландшафты характеризуются увеличением уровня почвоутомления в зависимости от степени загрязнения. Острое и хроническое загрязнения почв ингибировали суммарную сухую биомассу растений, всхожесть растений (до 100% ингибирования), что подтверждается исследованиями других авторов [Тупицина с соавт., 2001; Реутова, 2008]. Причем отмечено ингибирование в большей степени корней, чем проростков растений. На загрязненных почвах причиной гибели растений и снижения продуктивности сельскохозяйственных культур являются ухудшение свойств почвы и непосредственное токсическое действие поллютантов на растения [Хазиев, Фатхиев, 1981; Зарипова с соавт., 2001; Ekundayo *et al.*, 2001; Киреева с соавт., 2006]. Отмечено преобладание в образцах почв зоны техногенеза биомассы грибов над биомассой бактерий, доминирование токсинообразующих грибов в структуре сообщества почвенных микромицетов.

2. Характеристика грибов рода *Trichoderma*

Плодородие почв существенно зависит от состояния почвенной биоты, в частности, от наличия микроорганизмов-супрессоров, затрудняющих развитие фитопатогенных форм микобиоты в критический для нее период [Филипчук, 1997; Хамова и др., 2002]. К таким микроорганизмам-супрессорам относят представителей бактерий рода *Pseudomonas*, *Bacillus*, из грибов – рода *Trichoderma* [Kubicek *et al.*, 2001; Benítez *et al.*, 2004; Ленглер, 2005; Алимова и др., 2007]. Благодаря особенностям роста и физиологических свойств они играют важную роль в формировании микробиоценозов ризосферы и почвы, а так же в росте и развитии растений [Howell, Puckhaber, 2005; Segarra *et al.*, 2006]. Почвы Юго-Восточного Закарья характеризовались следующим видовым составом микромицетов рода *Trichoderma*: *T.citrinoviride*, *T.longibrachiatum*, *T.harzianum*, *T.atroviride*, *T.asperellum*, *T.koningii*. Штаммы идентифицированы с помощью морфологических и молекулярно-генетических методов. Мишенью воздействия антропогенной нагрузки в почвах Юго-Восточного Закарья явилось видовое разнообразие этих микромицетов – из 4 видов в контрольной почве до 1 вида в почве с острым загрязнением. Выделенный штамм *T. asperellum* обладал адаптацией к высокой концентрации нефти.

Влияние тяжелых металлов на жизнедеятельность *Trichoderma*

Многие ионы металлов играют чрезвычайно важную роль во множестве самых разнообразных биологических процессов. Они входят в состав ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции, перенос групп, гидролитические процессы и т.д. [Kredics *et al.*, 2000]. Однако повышенные концентрации ТМ при загрязнении могут как угнетать и даже привести к гибели чувствительных микроорганизмов, так и стимулировать развитие устойчивых видов [Bruins *et al.*, 1999; Марфенина, 2005]. Нами изучено влияние тяжелых металлов на *Trichoderma* на уровне сообщества в опытах *in vivo*, популяции, организма и клетки в опытах *in vitro*. С возрастанием антропогенной нагрузки увеличилась гетерогенность популяции, характеризующаяся разной скоростью роста, антагонистической активностью, увеличением числа клонов с l-стратегией жизни и фитотоксичности. В составе гетерогенной популяции нео-типа *T.longibrachiatum* выщепились клоны с фитотоксичными свойствами. Под действием ТМ отмечено изменение морфологических характеристик *Trichoderma*, которые выражаются в характере роста, внешнем виде колоний: переход от паутинистого к шерстистому характеру роста мицелия, появлении ловчих колец у *T.longibrachiatum* 551. Последствие металлов проявилось на уровне конидий в увеличении площади конидий за счет появления выростов, что указывает на адаптивный механизм реакции микроорганизма.

В результате воздействия соли алюминия выявлена стимуляция конидиегенеза при всех концентрациях (максимальное - $108 \cdot 10^4$ спор при 0.4 мг/л), соли меди – при 0.1 мг/л ($118 \cdot 10^4$ спор) при уменьшении размера конидий. Построен ряд по убыванию чувствительности размера конидий к металлам: $Cu > Ni > Al > (Mn-Fe-Zn)$. При культивировании *T.asperellum* 302 на среде с добавлением цинка общий выход биомассы увеличивался вдвое по сравнению с другими металлами ($FeSO_4$ и $CuSO_4$) и на 20% превышал выход контрольного варианта. Одна из наиболее четко прослеживаемых реакций на антропогенные воздействия у почвенных грибов это изменение уровня прорастания спор [Марфенина, 2005]. Выявлена дозоспецифичность скорости прорастания конидий *T.asperellum* 302 - Al (0.1-0.8 мг/мл), Cu (0.1-0.4 мг/мл).

Исследование природы взаимоотношения ТМ с аборигенным штаммом *T.viride* 500₁ вольт-амперометрическим методом показало накопление частиц меди на поверхности *Trichoderma* и утолщение клеточной стенки (в условиях глубинном культивировании с медным купоросом). Причем сигнал (ток, мкА) увеличивался в 2 раза по мере возрастания концентрации меди в среде в 5 раз.

Несмотря на то, что грибы рода *Trichoderma* не относятся к списку грибов, наиболее часто становящихся причиной аллергических заболеваний, сведения о потенциальной способности вызывать аллергические реакции представителями этого рода являются важными в связи с широким использованием в биотехнологической промышленности [Александрова с соавт., 2004; Roldán *et al.*, 2005; Алимова с соавт., 2007]. Известно, что различия в иммунологическом спектре между штаммами одного вида одноклеточных форм грибов могут быть

связаны с мутациями, особенностями биохимического состава среды, обуславливающими изменение синтеза отдельных клеточных компонентов [Бабьева, Чернов, 2004]. Следовательно, можно ожидать, что антигенный (аллергенный) состав *Trichoderma* будет иметь свои особенности в зависимости от условий среды, например от присутствия повышенных концентраций ТМ в техногенных ландшафтах. Исследовалось влияние солей цинка, меди и железа (0.40, 0.05 и 0.025 мг/мл, соответственно) на состав экстрагируемых антигенов *T. asperellum* 302. При культивировании *T. asperellum* 302 на среде с добавлением цинка выход экстрагируемого антигена в 2 раза превышал остальные варианты.

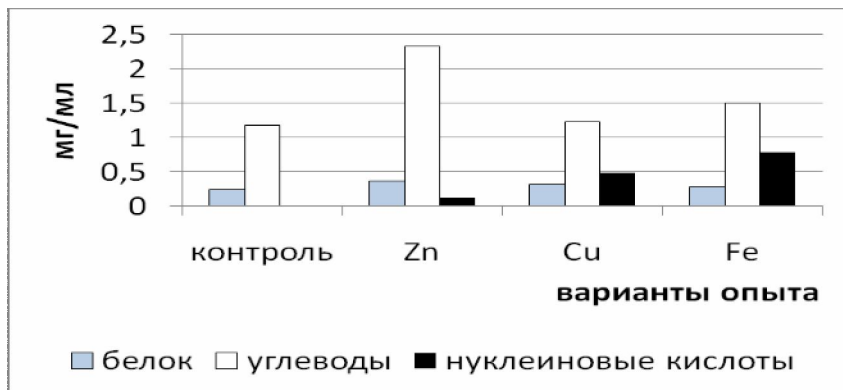


Рис. 4. Состав антигенных препаратов *T. asperellum* при культивировании на средах с металлами.

Полученные препараты антигенов в основном состояли из углеводных компонентов (рис. 4). Показана полисахаридная природа антигенов и отсутствие перекрестных реакций экстрагируемых антигенов *T. asperellum* с аллергенами других грибов

Практическое использование грибов рода *Trichoderma*

Ряд публикация указывает на возможность использования почвенных микроорганизмов для восстановления биологической активности и супрессивности техногенных ландшафтов [Чулкина, 2000; Емцев, Мишустин, 2005; Harman *et al.*, 2004]. Выделенный из черноземов Юго-Восточного Закамья аборигенный изолят *T. asperellum* был интродуцирован нами в антропогенные ландшафты с целью восстановления супрессивности. Штамм был отобран на основании соответствия следующим биотехнологическим требованиям: высокая антагонистическая активность к выделенным патогенам картофеля (возбудители альтернариоза *Alternaria solani* и фузариоза *Fusarium spp.*), отсутствие генотоксичности и фитотоксичности по отношению к микрорастениям семенного картофеля, низкий уровень антигенов.

Интродукция отобранного штамма *T. asperellum* в тепличный грунт позволила снизить численность и частоту встречаемости потенциально опасных патогенных и токсинообразующих микроорганизмов, и повысить урожайность микроклубней безвирусного семенного картофеля сорта Розара на 11%.

Грибы рода *Trichoderma* применяются и в других областях агропромышленного комплекса – в кормопроизводстве используется их ферменты гидролазы [Алимова с соавт., 2007]. Нами проведено сравнительное изучение ксиланазной и протеолитической активностей выделенных штаммов

Trichoderma. Для изучения возможности использования этих грибов при производстве кормового белка использован отход спиртового производства – барда. Исследование ферментативной активности для применения в качестве добавки в рацион моногастричных животных проводилось на среде с щелочным ржаным экстрактом. Максимальная ксиланазная и протеазная активность при культивировании на послеспиртовой барде выявлена у штаммов T.556 и *T.longibrachiatum* 551₂ (7.98 IU/ml и 98 IU/ml, соответственно). Максимальная ксиланазная и протеазная активность при культивировании на щелочном ржаном экстракте выявлена для штамма *T.longibrachiatum* 551₃ и *T.viride* 500₁ (8.51 IU/ml и 154.33 IU/ml, соответственно). Все исследуемые штаммы гидролизуют сложные полисахариды. Степень гидролиза за 5 дней составила 42.9 %.

ВЫВОДЫ

1. Антропогенная нагрузка в виде синергического воздействия высоких концентраций тяжелых металлов на фоне острого и хронического типов нефтезагрязнения в выщелоченных черноземах Юго-Восточного Закамья снижает напряженность биологических процессов в почвах. Мишенями антропогенного воздействия являются микроорганизмы, участвующие в круговороте азота, формирования гумуса, а также целлюлазная и протеазная активности почв.
2. Отмеченное количественное и функциональное изменение в структуре микробного сообщества черноземов Юго-Восточного Закамья позволяет отнести исследуемую техногенную нагрузку в местах разлива к «зоне резистентности». Восстановление биологической активности черноземов в зоне техногенного воздействия зависит от сроков рекультивации.
2. Охарактеризованы сообщества микромицетов рода *Trichoderma* техногенных ландшафтов, включавшие в себя 6 видов. Воздействие тяжелых металлов на фоне нефтезагрязнения привело к снижению видового разнообразия рода *Trichoderma*, изменениям в структуре популяции в сторону возрастания числа клонов с I-стратегией жизни, фитотоксичностью и увеличению углеводов в составе антигенов.
3. Последствие тяжелых металлов в опытах *in vitro* на уровне конидий *Trichoderma* проявляется в увеличении конидиегенеза и площади поверхности клетки за счет появления выростов. Отмечено накопление частиц меди на поверхности вегетативных органов и утолщение клеточных стенок микромицета.
4. Показана возможность использования высокоэффективных аборигенных штаммов из черноземов Юго-Востока РТ для восстановления супрессивности сельскохозяйственных угодий. В результате интродукции *T.asperellum* 2 в тепличный грунт для защиты семенного картофеля отмечено снижение инфекционной нагрузки (в 3-5 раз) и частоты встречаемости потенциально фитопатогенных и токсинообразующих микромицетов (с 30% до 10%), что позволило повысить урожайность микроклубней безвирусного семенного

картофеля сорта Розара на 11%.

5. Показана возможность использования высокоэффективных аборигенных штаммов из черноземов Юго-Востока РТ для использования в кормопроизводстве.

Основные публикации по теме диссертации

1. **Тазетдинова, Д.И.** Подбор исходного материала для создания сортов картофеля, обладающих устойчивостью к фитофторозу / Д.И. Тазетдинова, З.З.Салихова, З.Сташевски, Ф.К. Алимова // Тезисы докладов. Итоговая научно-образовательная конференция студентов Казанского государственного университета 2004 года. – Казань, 2004. – С.12.
2. **Тазетдинова, Д.И.** Новые биопрепараты для сельского хозяйства / Д.И. Тазетдинова, Ф.К. Алимова // Итоговая научная конференция КГУ. – 2005.- С.22
3. **Тазетдинова, Д.И.** Создание сортов картофеля. Устойчивость к фитофторозу исходного материала / Д.И. Тазетдинова, З. Сташевски, З.З. Салихова, Ф.К. Алимова // Вестник ТО РЭА. – 2005. – №2. – С. 34-36.
4. Алимова, Ф.К. Взаимоотношения *Trichoderma*, распространенной на территории республики Татарстан, с микроорганизмами и растениями / Ф.К. Алимова, Р.И. Тухбатова, **Д.И. Тазетдинова**, Ф.Х.А. Кабрера, Л.Ю. Каримова. // Грибы и водоросли в биоценозах – 2006: Материалы международной конференции, посвященной 75-летию Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова: Москва, 31 января - 3 февраля 2006 г. – М.: МАКС Пресс, 2006. – С. 12-13.
5. **Тазетдинова, Д.И.** Оценка факторов риска, обусловленных загрязнением почв / Д.И. Тазетдинова, Р.И. Тухбатова, А. Кабрера, Ф.К. Алимова, Е.А. Тафеева // Итоги и перспективы научных исследований по проблеме экологии человека и гигиены окружающей среды. – Москва, 2006. – С. 477-482.
6. Karimova, Biodiversity and ecophysiology of *Trichoderma/Hypocrea* strains isolated from the human skull dated as VIII-VI B.C. discovered in the Murzichinsk II Tomb (Republic Tatarstan, Russia)/ L. Yu, I. Druzhinina, R.I. Tukhbatova, **D.I.Tazetdinova**, C.P.Kubicek, F.K.Alimova // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, April 6-8, 2006, Vienna, Austria. 2006. – P. 42.
7. Cabrera, F.H.A Interaction of fungi genus *Trichoderma* from the Republic of Tatarstan with microorganisms and plants / F.H.A Cabrera, R.T.Mukhametshina, R.I. Tukhbatova, **D.I.Tazetdinova**, F.K. Alimova // 10th annual Symposium of Biology Students in Europe, Ancona, 2-10 August, 2006. – P.122.
8. Alimova, F.K. *Trichoderma/Hypocrea* from Russia (Tatarstan Republic) – interaction with microorganism and plants / R.I. Tukhbatova, F.H.A. Cabrera, **D.I.Tazetdinova**, L.Yu. Karimova // 8th International Mycological Congress, 21-26 August, 2006. Cairns Convention Centre Queensland, Australia. – P. 204.

9. Алимова, Ф.К. Использование психрофильного вида *Trichoderma* для восстановления супрессивности почв республики Татарстан / Ф.К. Алимова, Ф.Э.А. Кабрера, Р.И. Тухбатова, Р.Т. Мухаметшина, Д.И. Тазетдинова // Материалы Международной научной конференции «Экология и биология почв», Ростов-на-Дону 19 – 22 апреля 2006г. - Ростов-на-Дону, 2006. – С.10.
10. Шишкин, А. В. Кинетическая характеристика изолятов микромицета рода *TRICHODERMA* секции: *Trichoderma*, *Pachybasium*, *Longibrachiatum*, выделенных из разных источников местообитания / А.В. Шишкин, Э.А. Рафаилова, А. Кабрера, Р.Т. Мухаметшина, Д.И. Тазетдинова, Р.И. Тухбатова, Ф. К. Алимова // Сборник тезисов XIV международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2007», Москва. – С. 100.
11. Тазетдинова, Д.И. Способ биологической девакации почв с помощью грибов рода *Trichoderma* / Д.И. Тазетдинова, Ф.К. Алимова // Тезисы докладов научно-практической межвузовской конференции молодых ученых и студентов, посвященной 85-летию санитарно-эпидемиологической службы и году ребенка города Казани. – Казань: КГМУ, 2007. – С.44.
12. Рафаилова, Э. А. Морфологическая характеристика изолятов микромицета рода *TRICHODERMA* секции: *Trichoderma*, *Pachybasium*, *Longibrachiatum*, выделенных из разных источников местообитания / Э.А. Рафаилова, А.В. Шишкин, А. Кабрера, Р.Т. Мухаметшина, Д.И. Тазетдинова, Р.И. Тухбатова, Ф.К. Алимова // Сборник тезисов XIV международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2007.– С. 103.
13. Cabrera, F. H. A. Identification and phytotoxic properties of fungi genus *Trichoderma* from ancient lands / F. H. A. Cabrera, R.T. Mukhametshina, E.A. Rafailova, A.V. Shishkin, R.I. Tuxbatova, D.Yu. Tazetdinova, F.K. Alimova // Сборник тезисов XIV международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2007». – С. 103 - 104.
14. Кабрера, А. Способ биологического восстановления почв с помощью грибов рода *Trichoderma* / А. Кабрера, Р.И. Тухбатова, Р.И. Мухаметшина, Э.А. Рафаилова, А.В. Шишкин, Д.И. Тазетдинова, Ф.К. Алимова // Сборник тезисов 11-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых. – Пущино, 2007. – С. 203.
15. Кабрера, А. Антагонистическая активность изолятов *Trichoderma koningii* в опытах in vitro / А. Кабрера, Р.И. Тухбатова, Р.И. Мухаметшина, Э.А. Рафаилова, А.В. Шишкин, Д.И. Тазетдинова, Ф.К. Алимова // Сборник тезисов 11-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых. – С. 204.
16. Шишкин, А.В. Влияние абиотических факторов на рост и размножение микромицетов рода *Trichoderma*, выделенных из различных источников местообитания / А.В. Шишкин, Э.А. Рафаилова, Ф.Э.А. Кабрера, Р.И. Мухаметшина, Р.И. Тухбатова, Д.И. Тазетдинова, Ф.К. Алимова // Сборник тезисов 11-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых. – Пущино, 2007. – С. 53.

17. Мухаметшина, Р.И. Гетерогенность популяций аборигенных изолятов рода *Trichoderma* / Р.И. Мухаметшина, Ф.Э.А. Кабрера, С.В. Молина, Р.И. Тухбатова, Э.А. Рафаилова, А.В. Шишкин, **Д.И. Тазетдинова**, Ф.К. Алимова. Сборник тезисов 11-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых. – Пущино, 2007. – С. 102.
18. Мухаметшина, Р.И. Морфологическое описание и кинетические параметры мезофильных видов рода *Trichoderma* / Р.И. Мухаметшина, Э.А. Рафаилова, Ф.Э.А. Кабрера, А.В. Шишкин, Р.И. Тухбатова, **Д.И. Тазетдинова**, Ф.К. Алимова. Сборник тезисов 11-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых. – Пущино, 2007. – С. 40.
19. Рафаилова, Э.А. Морфологическая характеристика и молекулярно-генетический анализ изолятов микромицетов рода *Trichoderma*, выделенных из различных источников местообитания / Э.А. Рафаилова, А.В. Шишкин, Ф.Э.А. Кабрера, Р.И. Мухаметшина, Р.И. Тухбатова, **Д.И. Тазетдинова**, Ф.К. Алимова // Сборник тезисов 11-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых. – Пущино, 2007. – С. 44.
20. Cabrera, F. H. A. Interaction of fungi genus *Trichoderma* from the Republic of Tatarstan with microorganisms and plants / F. H. A. Cabrera, R. T. Mukhametshina, R.I. Tukhbatova, **D. R. Tazetdinova**, F. K. Alimova // International Mycological SymBioSE Italy 2006 - P. 82-83.
21. Алимова, Ф.К. Биотехнология. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*: учебно-методическое пособие / Ф.К.Алимова, **Д.И. Тазетдинова**, Р.И. Тухбатова. – Казань: УНИПРЕСС ДАС, 2007. – С. 234.
22. Тухбатова, Р.И. Характеристика потенциально патогенных видов *Trichoderma*, выделенных на территории республики Татарстан / Р.И. Тухбатова, **Д.И. Тазетдинова**, Ф.К. Алимова // Пятый Всероссийский конгресс по медицинской микологии. 28–30 марта 2007. “Успехи медицинской микологии” Том X Глава I Современная эпидемиология микозов человека. Организация борьбы с массовыми грибковыми инфекциями. – С. 31.
23. Скворцов, Е.В. Использование *Trichoderma* в процессе переработки отходов спиртового производств / Е.В.Скворцов, Р.И. Тухбатова, **Д.И. Тазетдинова**, Т.А. Мельникова, Ф.К.Алимова / Ученые записки Казанского государственного университета. – в печати.
24. Тухбатова, Р.И. Микроорганизмы палеопочв республики Татарстан / Р.И. Тухбатова, **Д.И. Тазетдинова**, Ф.К.Алимова, Л.В.Мельников // Ученые записки Казанского государственного университета. – 2008. –Т. 150, кн.2. – С. 225-230.
25. Рафаилова, Э.А. Влияние абиотических факторов на рост и размножение микромицетов рода *Trichoderma* / Э. А. Рафаилова, А. В. Шишкин, Э.А.Ф. Кабрера, **Д.И. Тазетдинова**, Р.И. Тухбатова, Ф.К.Алимова // Ученые записки Казанского государственного университета. – 2008. – Т. 150, кн.2. – С.167-175.
26. Рафаилова, Э.А. УДК 579.64 Сравнительные морфологические характеристики изолятов микромицетов рода TRICHODERMA, выделенных из

разных местообитаний и влияние абиотических факторов на рост и размножение микромицетов / Э.А. Рафаилова, А.В. Шишкин, А.Ф. Кабрера, **Д.И. Тазетдинова**, Р. И. Тухбатова; Казанск. Гос. Ун-т. – Казань, 2007. – 14 с.: 7 ил.- Библиогр.: 20 назв. – Рус. – Деп. В ВИНТИ 07.05.07 № 505-B2007.

27. Рафаилова, Э.А. Высокопродуктивный штамм - продуцент ксиланаз для кормопроизводства /Э. А. Рафаилова, Р. И. Тухбатова, **Д.И. Тазетдинова** // VII Всероссийская выставка научно-технического творчества молодежи НТТМ–2007, Москва, 26-29 июня 2007.- С. 242-243.

28. Кабрера, Ф.Э.А. *Trichoderma koningii* в биологическом контроле *Fusarium oxysporum* / Ф.Э.А. Кабрера, Р.Т. Мухаметшина, Э.А. Рафаилова, **Д.И. Тазетдинова**, Р.И. Тухбатова // Материалы международной научной конференции “Микроорганизмы и биосфера”, Москва, 2007.- С.48-49.

29. Кабрера, Ф.Э.А. Подбор компонентов питательных сред для биотехнологические важных штаммов грибов рода *Trichoderma* / Ф.Э.А. Кабрера, С.В. Молина, Р.Т. Мухаметшина, Э.А. Рафаилова, **Д.И. Тазетдинова**, Р.И. Тухбатова // Материалы 3 международной молодежной конференции “Актуальные аспекты современной микробиологии”, Москва, 2007.- С. 42-43.

30. Рафаилова, Э.А. Молекулярно-генетический анализ изолятов рода *Trichoderma*, выделенных из различных экологических ниш / Э.А. Рафаилова, **Д.И. Тазетдинова**, Р.И. Тухбатова // Материалы 3 международной молодежной конференции “Актуальные аспекты современной микробиологии”, Москва, 2007.-С. 94-95.

31. **Тазетдинова, Д.И.** Биологическая активность выщелоченных черноземов Юго-Востока республики Татарстан / Д.И. Тазетдинова, Р.И. Тухбатова, Э.А. Рафаилова, Ф.К.Алимова // II-ая Международная научно-практическая конференция «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии», 2008. – С. 128-129.

32. **Тазетдинова, Д.И.** Микробиологический анализ почвы после выращивания безвирусного картофеля сорта Вализа /Д.И. Тазетдинова, Р.А. Габитов, Э.А. Рафаилова // II-ая Международная научно-практическая конференция «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии», 2008. – С. 24-25.

33. Михайлова, И.М. Исследование протеазной активности микромицетов рода *Trichoderma* / И.М. Михайлова, **Д.И. Тазетдинова**, А.В. Шишкин // II-ая Международная научно-практическая конференция «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии», 2008. – С. 87.

34. Панкова, А.В. Микробиологический мониторинг тепличного грунта и клубней безвирусного картофеля сортов, культивируемых в РТ / А.В. Панкова, Р.И. Тухбатова, **Д.И. Тазетдинова** // II-ая Международная научно-практическая конференция «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии», 2008. – С. 100-101.

35. Согорин, Е.А. Антибиотическая активность и генотоксичность гриба рода *Trichoderma* / Е.А. Согорин, **Д.И. Тазетдинова**, Р.И. Тухбатова // II-ая Международная научно-практическая конференция «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии», 2008. – С. 125-126.
36. Рафаилова, Э.А. Первые находки в гидросфере антропогенного ландшафта *Trichoderma brevicompactum* на территории РТ. / Э.А. Рафаилова, Р.И. Тухбатова, **Д.И. Тазетдинова**, Ф.Э.А. Кабрера, Р.Т. Мухаметшина, Ф.К.Алимова // Вода: химия и экология. – в печати.
37. Рафаилова, Э.А. Влияние активированной воды на микромицеты рода *Trichoderma* / Э.А. Рафаилова, Р.И. Тухбатова, **Д.И. Тазетдинова**, Ф.К.Алимова // Вода: химия и экология. – 2008. - №2. – С. 35-40.
38. **Тазетдинова, Д.И.** Биопрепарат для культивирования безвирусного картофеля / Д.И. Тазетдинова, Р.И. Тухбатова, Э.А. Рафаилова, Ф.К. Алимова // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2008. –Т.3, №3. – С. 18-22.
39. **Тазетдинова, Д.И.** Влияние загрязнения тяжелыми металлами на целлюлазную активность почв Альметьевского района республики Татарстан/ Д.И. Тазетдинова, Р.И. Тухбатова, Э.А. Рафаилова, Ф.К. Алимова // Плодородие. – в печати.
40. Куликов, С.Н. Влияние ионов металлов (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+}) на антигенные свойства производственного штамма *Trichoderma asperellum* Samuels / С.Н.Куликов, С.А.Лисовская, Х.Г. Хиад, Ю.А.Тюрин, **Д.И. Тазетдинова**, Р.И. Тухбатова, Н.И.Глушко, Ф.К.Алимова // Проблемы Медицинской Микологии. – в печати.
41. Алимова Ф.К., Тухбатова Р.И., **Тазетдинова Д.И.**, Скворцов Е.В. Штамм гриба *Trichoderma asperellum* и способ его применения. №2008108034/13(008691). (Принято к рассмотрению).
42. Алимова Ф.К., Тухбатова Р.И., **Тазетдинова Д.И.** Штамм гриба *Trichoderma asperellum* и способ его применения. № 2008108035 от 12.05.2008. (Принято к рассмотрению).
43. **Тазетдинова, Д.И.** Перспективные методы сельскохозяйственной биотехнологии / Д.И. Тазетдинова, Ф.К. Алимова, О.Р. Латыпов, Р.И. Тухбатова, А.Х. Яппаров // Рекомендации. - Казань, 2008. - 19 с.
44. **Тазетдинова Д.И.** Основы компостирования в сельском хозяйстве / Д.И. Тазетдинова, Ф.К. Алимова, Н.Н. Кузнецова, Р.И. Тухбатова, И.А. Дегтярева, А.Х. Яппаров // Рекомендации. - Казань, 2008. - 19 с.

e-mail: tazetdinova_d@rambler.ru

факс: (843) 2315360, 2387121.